

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-127855

(43)Date of publication of application : 18.05.1999

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
C07K 16/24
C12P 21/08
// A61K 39/395

(21)Application number : 09-293994

(71)Applicant : JAPAN ENERGY CORP

(22)Date of filing : 27.10.1997

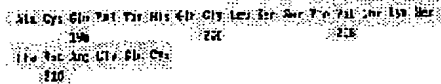
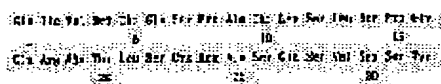
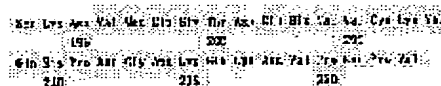
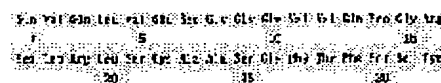
(72)Inventor : ONO ISAO
IHARA SEIJI
TAKEKOSHI MASATAKA
TAKEKOSHI FUMIKO

(54) RECOMBINANT-TYPE ANTI-HUMAN TNF-ALPHA HUMAN MONOCLONAL ANTIBODY

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To produce the subject antibody having high purity suitable for an experimental reagent or a clinical application by applying a gene recombination technique by using a host *Escherichia coli*.

SOLUTION: This recombinant-type anti-human TNF- α human monoclonal antibody is composed of an H chain having an amino acid sequence of formula I and acting as an H chain of anti-human TNF- α human monoclonal Fab antibody and an L chain having an amino acid sequence of formula II and acting as an L chain of anti-human TNF- α human monoclonal Fab antibody. The recombinant-type anti-human TNF- α human monoclonal antibody is obtained by selecting and collecting a cDNA of the human antibody from a human B lymphocytes cell producing an anti-human TNF- α human antibody such as an anti-human TNF- α human monoclonal antibody producing 1D5 strain (EBV transformed B lymphocytes oligo clone), introducing the cDNA into a manifestation vector producing a human Fab antibody in an Escherichia coli by a gene recombination and culturing its transforming bacterium.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-127855

(43) 公開日 平成11年(1999) 5月18日

(51) Int.Cl.⁹
C 1 2 N 15/09
C 0 7 K 16/24
C 1 2 P 21/08
// A 6 1 K 39/395

識別記号

Z N A

F I

C 1 2 N 15/00
C 0 7 K 16/24
C 1 2 P 21/08
A 6 1 K 39/395

A

Z N A

N

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 22 頁)

(21) 出願番号 特願平9-293994

(22) 出願日 平成9年(1997)10月27日

(71) 出願人 000231109

株式会社ジャパンエナジー

東京都港区虎ノ門二丁目10番1号

(72) 発明者 小野 魁

東京都小平市学園西町3-1-26

(72) 発明者 井原 征治

神奈川県秦野市下大槻410 下大槻団地2-14-301

(72) 発明者 竹腰 正隆

神奈川県伊勢原市大住台3-9-1 ベル
フララーズ大住台2-501

(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組換え型抗ヒトTNF- α ヒトモノクローナル抗体

(57) 【要約】

【課題】 宿主大腸菌により生産することができるヒトTNF- α に対する組換え型ヒトモノクローナル抗体、並びに該組換え型抗体を構成するL鎖とH鎖をそれぞれコードするDNAの提供。

【解決手段】 配列番号1に示すアミノ酸配列(1)又はこの配列において1もしくは複数のアミノ酸残基が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列を有し、抗ヒトTNF- α ヒトモノクローナルFab抗体のH鎖として機能するH鎖、及び配列番号3に示すアミノ酸配列(1)又はこの配列において1もしくは複数のアミノ酸残基が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列を有し、抗ヒトTNF- α ヒトモノクローナルFab抗体のL鎖として機能するL鎖からなる組換え型抗ヒトTNF- α ヒトモノクローナル抗体、並びに該抗体のH鎖とL鎖のアミノ酸配列をそれぞれコードするDNA。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1に示すアミノ酸配列（I）又はこの配列において1もしくは複数のアミノ酸残基が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列を有し、抗ヒトTNF- α ヒトモノクローナルFab 抗体のH鎖として機能するH鎖、及び配列番号3に示すアミノ酸配列（II）又はこの配列において1もしくは複数のアミノ酸残基が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列を有し、抗ヒトTNF- α ヒトモノクローナルFab 抗体のL鎖として機能するL鎖からなる組換え型抗ヒトTNF- α ヒトモノクローナル抗体。

【請求項2】 配列番号1に示すアミノ酸配列（I）又はこの配列において1もしくは複数のアミノ酸残基が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列を有し、抗ヒトTNF- α ヒトモノクローナルFab 抗体のH鎖として機能する抗体のH鎖をコードするDNA。

【請求項3】 配列番号2に示す塩基配列で示されるcDNAである請求項2記載のDNA。

【請求項4】 配列番号3に示すアミノ酸配列（II）又はこの配列において1もしくは複数のアミノ酸残基が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列を有し、抗ヒトTNF- α ヒトモノクローナルFab 抗体のL鎖として機能する抗体のL鎖をコードするDNA。

【請求項5】 配列番号4に示す塩基配列で示されるcDNAである請求項4記載のDNA。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ヒトTNF- α に対する組換え型ヒトモノクローナル抗体、並びに該組換え型抗体を構成するL鎖とH鎖をそれぞれコードするDNAに関する。この組換え型抗体は、前記のL鎖とH鎖をそれぞれコードするDNAを宿主大腸菌においてヒトFab 抗体の産生を行う発現ベクター中に遺伝子組換えにより導入した発現ベクターを用いて、大腸菌により生産されるものである。

【0002】

【従来の技術】他の哺乳動物の抗体がその哺乳動物のBリンパ球細胞により産生されるのと同様に、ヒト抗体はヒトのBリンパ球細胞が産生する。原理的には、目的とするヒト抗体を産生するBリンパ球細胞を選別し、ハイブリドーマ細胞として、目的とするモノクローナル抗体をこのハイブリドーマ細胞を培養することで得ることができる。しかしながら、ヒト細胞を用いたこの種のハイブリドーマ細胞作製の場合、細胞融合に利用されるヒト抗体を産生するBリンパ球細胞試料等の十分な提供が望めず、現実的ではない。そのため、幾つかの代替技術の開発が進められており、例えば、提供された元となるヒト抗体を産生するBリンパ球細胞にEpstein-Barrウイルス（EBウイルス）を感染させ、不死化処理を施し、この細胞を増殖させ、その細胞群から目的とするモノクロ

ーナル抗体を産生するB細胞をクローニングする方法等が適用される。

【0003】但し、この不死化処理を施した細胞群からシングルクローンを選別すること自体必ずしも成功するものでもなく、また、EBウイルスに感染した細胞の培養により生産されるヒト抗体は、臨床応用に適合するものとするためには、該EBウイルスによる汚染を除くため、煩雑な精製操作が不可欠なものとなる。あるいは、研究目的の試薬として利用する場合にも、該EBウイルスによる汚染は不都合な場合が多く、更には、生産性自体決して高いものとはいえないのが現状である。これらの制約から脱するために、元となるヒト抗体を産生するBリンパ球細胞より、抗体遺伝子を採取し、宿主大腸菌においてヒトFab 抗体の産生を行う発現ベクターを利用して、目的とする抗体遺伝子を組み込んだ菌株を用いて、組換え型抗体を安定かつ大量に生産する技術が模索されている。

【0004】ヒトTNF- α （tumor necrosis factor α ；腫瘍壊死因子 α ）は、主として活性化マクロファージ細胞が産生する細胞障害活性をもつ蛋白質因子である。特に、腫瘍細胞に対して際だった細胞障害活性を示すものであるが、通常の免疫反応においても産生されており、炎症性疾患においても、組織細胞の損傷を引き起こす一つの要因として作用している。この内因性の蛋白質因子に対する抗体が存在することは確認されており、何らかの調節機構の一翼を担っていると考えられる。従って、抗ヒトTNF- α ヒト抗体も、他のヒト抗体と同様に臨床応用の可能性について基礎的な検討がなされている。その目的に適合する高い純度を有して、かつモノクローナル化された抗ヒトTNF- α ヒト抗体の安定供給が望まれている。しかしながら、現状では、他のヒト抗体の多くと同様、抗ヒトTNF- α ヒトモノクローナル抗体の十分な供給はなされておらず、遺伝子組換え技術を用いた抗ヒトTNF- α 組換え型ヒト抗体、その生産方法の開発が望まれている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、前記の課題を解決するもので、本発明の目的は、遺伝子組換え技術を利用して、宿主大腸菌により生産することができるヒトTNF- α に対する組換え型ヒトモノクローナル抗体を提供すること、並びに該組換え型抗体を構成するL鎖とH鎖をそれぞれコードするDNAを提供することにある。即ち、抗ヒトTNF- α ヒト抗体を産生するヒトBリンパ球細胞から、該ヒト抗体のcDNAを選別・採取するとともに、このcDNAを大腸菌においてヒトFab 抗体の産生を行う発現ベクター中に遺伝子組換えにより導入し、得られる形質転換菌の培養により目的とする、ヒトTNF- α に対するヒトFab 抗体を得ることを目的とするものである。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、前記の目的をもって、鋭意研究を進め、大腸菌においてFab 抗体を産生する発現ベクターpFab-His2 にヒト抗体のL鎖及びH鎖をコードする遺伝子を組換え導入することで、大腸菌に組換え型ヒトFab 抗体を生産させることが可能であることを確認した。更に、好意により提供を受けた健康人の血液試料からヒトBリンパ球細胞を分離し、EBウイルスを感染させ、不活化処理を施し、この細胞群を培養して、抗ヒトTNF- α ヒト抗体を産生する細胞株を選別することができた。次いで、前記の細胞株からヒト抗体をコードするcDNA複数を採取し、その塩基配列を解明するとともに、該cDNAを大腸菌の組換えFab抗体発現系に組み込みヒトFab 抗体を生産させ、そのうちの一つが抗ヒトTNF- α ヒト抗体を産生する菌株であることを見出した。即ち、大腸菌の組換えFab 抗体発現系を利用して、抗ヒトTNF- α ヒト抗体を産生する細胞株からクローニングを行い、抗ヒトTNF- α ヒトモノクローナル抗体を産生する菌株を選別し、更には、該クローンに組み込まれているcDNAが抗ヒトTNF- α ヒトFab抗体のL鎖及びH鎖をコードすることが判った。これら一連の研究により得られた知見に基づき、本発明を完成させるに至った。

【0007】即ち、本発明の組換え型抗ヒトTNF- α ヒトモノクローナル抗体は、配列番号1に示すアミノ酸配列(I)又はこの配列において1もしくは複数のアミノ酸残基が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列を有し、抗ヒトTNF- α ヒトモノクローナルFab 抗体のH鎖として機能するH鎖、及び配列番号3に示すアミノ酸配列(II)又はこの配列において1もしくは複数のアミノ酸残基が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列を有し、抗ヒトTNF- α ヒトモノクローナルFab 抗体のL鎖として機能するL鎖からなる、宿主大腸菌により産生される組換え型ヒトFab 抗体であり、より具体的には、前記のH鎖及びL鎖をコードするDNAを大腸菌においてFab 抗体の産生が可能な発現ベクター系に遺伝子組換えにより導入した該組換え型抗ヒトTNF- α ヒトFab 抗体発現ベクターにより形質転換された大腸菌により生産される組換え型ヒトFab 抗体である。

【0008】また、本発明の抗ヒトTNF- α ヒトモノクローナル抗体のH鎖をコードするDNAは、配列番号1に示すアミノ酸配列(I)又はこの配列において1もしくは複数のアミノ酸残基が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列を有し、抗ヒトTNF- α ヒトモノクローナルFab 抗体のH鎖として機能する抗体のH鎖をコードするDNA、好ましくは配列番号2に示す塩基配列で示されるcDNAである。一方、抗ヒトTNF- α ヒトモノクローナル抗体のL鎖をコードするDNAは、配列番号3に示すアミノ酸配列(II)又はこの配列において1もしくは複数のアミノ酸残基が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列を有し、抗ヒトTNF- α ヒト

モノクローナルFab 抗体のL鎖として機能する抗体のL鎖をコードするDNA、好ましくは配列番号4に示す塩基配列で示されるcDNAである。なお、発現系においては、前記のH鎖をコードするDNAとL鎖をコードするDNAは一对として、ヒトFab 抗体に翻訳されるものである。

【0009】

【発明の実施の形態】本発明の抗ヒトTNF- α ヒトモノクローナル抗体、そのH鎖及びL鎖をコードするDNA、並びにそれらの調製方法についてより詳しく説明する。天然の抗体である免疫グロブリン(Ig)は、L鎖とH鎖のヘテロ二量体が二対結合した4本鎖のポリペプチドからなり、全体として、H鎖のC末端側のサブドメインであり、抗体活性はないが補体結合能を有する結晶性のFc領域と、抗原結合部位を形成しており、H鎖の残部とそれとジスルフィド結合により結合しているL鎖からなる2つの等しいFab 領域からなりたっている。

【0010】本発明の組換え型ヒトFab 抗体は、前記のFab 領域部分に相当するもので、Fc領域を構成するH鎖のC末端側のサブドメインを欠いたH鎖の残部とそれとジスルフィド結合により結合しているL鎖のみから構成されている。従って、前記のアミノ酸配列(I)は、本来のH鎖のC末端側のサブドメインを欠いた部分のペプチド鎖を示すものである。なお、アミノ酸配列(II)は、L鎖全体のペプチド鎖を示すものである。

【0011】一方、免疫グロブリンのH鎖には、 γ 鎖、 α 鎖、 μ 鎖、 δ 鎖及び ϵ 鎖の5種が存在するが、本発明の組換え型ヒトFab 抗体のH鎖は、 μ 鎖に分類されるものであり、同じく、L鎖には、 κ 鎖と λ 鎖の2種が存在するが、本発明の組換え型ヒトFab 抗体のL鎖は、 κ 鎖に分類されるものである。この分類は、L鎖において、その配列可変部分は、抗原に依存して主要部分のアミノ酸配列が変化するが、残る定常部分はアミノ酸配列が保存されており、この定常部分は κ 鎖と λ 鎖とでそれぞれ特徴的であり、同一種内では一致することを利用して、 κ 鎖であることの確認がなされる。また、H鎖においても、その配列可変部分は、抗原に依存して主要部分のアミノ酸配列が変化するが、残る定常部分の各鎖の種類に特徴的かつ普遍的なアミノ酸配列を利用して、その分類がなされる。

【0012】本発明では、健康人から提供された血液試料から、リンパ球を分別し、EBウイルスを感染させ、トランスフォームした細胞株群を作製し、次いで、これから、抗ヒトTNF- α ヒトモノクローナル抗体産生株ID 5株(EBV transformed B lymphocytes oligo clone)を選抜して、この細胞株を元となるBリンパ球細胞として用いた。このヒト抗体を産生するBリンパ球細胞から抽出した全RNAから、RT-PCR法を適用して、このL鎖における、 κ 鎖と λ 鎖の2種を分別するアミノ酸配列に着目して、それぞれを選択的に増幅可能なPCR プライマ

ーを用いて、予め κ 鎖と λ 鎖の区別をして、それぞれのcDNAを調製・増幅した。同じく、H鎖に関しても、 γ 鎖と μ 鎖に分類されるもののみを、それぞれ予め区別するPCRプライマーを用いて、選択的にcDNAを調製・増幅した。

【0013】その結果得られる個々の種類のcDNA、即ち、L鎖に関しては、 κ 鎖と λ 鎖の2種、H鎖に関しても、 γ 鎖と μ 鎖の2種について、その塩基配列をそれぞれ解読するため、cDNAの両端をそれぞれ制限酵素で切断した後、汎用のシークエンシングベクターにクローニングして、個々のクローンについて当該cDNA断片の塩基配列を解読した。なお、その際、シークエンシングベクターの既知塩基配列からシークエンシングを始め、+鎖及び-鎖の双方の塩基配列を解読して、互いに相補的であることを確認することで、読み間違いのないことを確かめた。この抗ヒトTNF- α ヒトモノクローナル抗体産生株1D5株(EBV transformed B lymphocyte s oligo clone)から、L鎖をコードするcDNAとして、 λ 鎖のものが1種、 κ 鎖のものが3種、H鎖をコードするcDNAとして、 γ 鎖のものが1種、 μ 鎖のものが1種、それぞれ存在することが判明し、該1D5株は実際にオリゴクローンであったことが確認された。

【0014】分離されたL鎖をコードするcDNA、具体的には、 λ 鎖のものが1種、 κ 鎖のものが3種、H鎖をコードするcDNA、具体的には、 γ 鎖のものが1種、 μ 鎖のものが1種から、L鎖をコードするcDNAとH鎖をコードするcDNAの各組み合わせについて、大腸菌においてFab抗体を産生する発現ベクターpFab-His2にクローニングして、発現ベクターを作製した。図1に示すとおり、発現ベクターpFab-His2はすでに報告されているヒトFabのファージディスプレイ用発現ベクターpRPLS/Fab-I(特開平8-116978号公報等を参照)を制限酵素Not IとEcoRIで切断してGene IIIを除去した後、6個のヒスチジンをコードするDNA断片を挿入したプラスミドである。図1に示す発現ベクターpFab-His2のクローニングサイトを利用して、L鎖をコードするcDNAは、制限酵素NheIとAsc Iの間に、H鎖をコードするcDNAは、制限酵素Sfi I切断部位とNot I切断部位の間に、それぞれ置換挿入される。

【0015】この複数種の発現ベクターをそれぞれ宿主大腸菌JM109株に導入して、発現ベクター内のマーカー遺伝子であるアンピシリン耐性遺伝子を用いて、アンピシリンプレート上でコロニーを形成させ、各コロニーを分離した。得られたコロニーから、無作為にコロニーを拾い出し、培養してイソプロピルー1-チオール β -D-ガラクトシド(IPTG)を添加し、Fab抗体産生を誘導した。その後、集菌し、凍結融解により菌体を破碎し、遠心により不溶性画分を分離し、上清を採取した。Fab抗体は、可溶性蛋白質として、この上清に回収されており、ヒトTNF- α に対する反応性を有するFab抗体の

有無を調べた。

【0016】前記の上清について、ヒトTNF- α を抗原とし、検出用抗体として、Fab特異的抗ヒトIgG抗体を用いてELISA法で評価したところ、L鎖をコードするcDNAとして、 κ 鎖3種類のうち、1種類のものと、H鎖をコードするcDNAとして、 μ 鎖1種類のものとを組み合わせたクローンのみにヒトTNF- α に対する反応性が確認された。上述した通り、この組み合わせについても、無作為に拾い出した12個のコロニーに対して、前記の評価を行ったが、ヒトTNF- α に対する反応性が明確に識別されるクローンが4株存在していた。このクローン4株について、再度組換えベクター内に組み込まれている κ 鎖をコードするDNAと μ 鎖をコードするDNAの塩基配列のシークエンシングを行ったところ、互いに一致しており、それぞれ、図4に示す塩基配列(II)及び図3に示す塩基配列(I)であった。従って、これらのクローン4株は、組換え型モノクローナル抗体である抗ヒトTNF- α ヒトFab抗体を産生する菌株であり、該ヒトFab抗体は、図3に示すとおり、H鎖(μ 鎖)として、塩基配列(I)のDNAから翻訳される前記のアミノ酸配列(I)を持ち、図4に示すとおり、L鎖として、塩基配列(II)のDNAから翻訳される前記のアミノ酸配列(II)を持つものであることが判明した。

【0017】なお、図3及び図4において、抗原のヒトTNF- α との結合に係わる相補性決定領域(complementarity determining region; CDR)を配列中に表記した。この組換え型モノクローナル抗体である抗ヒトTNF- α ヒトFab抗体を産生する菌株を作製する手順について、以下に具体的に述べる。

【0018】(1)全RNAの採取

健康人のリンパ球細胞をEBウイルスでトランスフォームした細胞群から、抗ヒトTNF- α ヒト抗体を産生する細胞株を選別した。このオリゴクローン;抗ヒトTNF- α ヒトモノクローナル抗体産生株1D5株の細胞 10^6 cellsから、市販の全RNA採取・精製キット;QIAGEN製RNeasyを用いて、全RNAを採取した。なお、詳細な操作手順は、該キットの標準プロトコールに従い、最終的に全RNAを水50 μ lに抽出した液を得た。含まれる全RNA量を、OD_{260nm}(波長260nmにおける吸光度;RNA分子による吸収)値から算定したところ、58 ng/ μ lであった。

【0019】(2)RT-PCR法によるL鎖をコードするcDNAとH鎖をコードするcDNAの作製

前記(1)で調製した全RNAから逆転写反応により、cDNAを作製し、次いで、PCR法を応用して、L鎖をコードするcDNAとH鎖をコードするcDNAをそれぞれ独立に増幅した。このRT-PCR法の操作には、市販のキット;宝酒造製のRNA PCR Kitを用い、具体的な操作は該キットの標準プロトコールに準じた。先ず、添付さ

れる逆転写反応液20 μ l 当たり、全RNA抽出液2 μ l を用い、逆転写プライマーとして、ランダム9 mer のプライマーを利用して、cDNAを調製した。

【0020】PCR 増幅に用いたプライマーを下記表1に示す。 κ 鎖をコードするcDNAのPCR 増幅には、5'側プライマーとして、VK3aF5プライマーを、3'側プライマーとして、VKC3プライマーをそれぞれ用いた。また、 μ 鎖をコードするcDNAのPCR 増幅には、5'側プライマーとして、VH3aF5プライマーとVH3bF5プライマーの二種

PCR 増幅用プライマー
VK3aF5プライマー
5'-CCGCTAGCGMCATYTCAGWTGACCCAGTCTCC-3'

VKC3プライマー
5'-TTGGCGCGCACACTCTCCCTGTTGAAGCTCTT-3'

VH3aF5プライマー
5'-AAGGCCCAACCGGCCATGGCCSARGTGACGCTGKTGGAGTCTGG-3'

VH3bF5プライマー
5'-AAGGCCCAACCGGCCATGGCCCGAGTGTGAGGTGCAGCTGTTGG-3'

FDM プライマー
5'-CCGCGCGCGCCAGCTCAGCAATCACTGGAAGAGG-3'

R: A又はG, Y: C 又はT, W: A 又はT, S: G 又はC, K: G 又はT, M: A 又はC

【0022】得られたPCR 産物は、市販の精製キット；QIAGEN製QIAquick PCR Purification Kit を用いて精製し、TE緩衝液（10 mM トリス塩酸，pH 8.0/1 mM EDTA）100 μ l で溶出回収した。

【0023】得られた μ 鎖をコードするcDNAのPCR 産物は、先ず、10 \times NEB2緩衝液11 μ l、制限酵素Sfi I 100 U/10 μ l を加え、50 $^{\circ}$ Cで3時間反応させた。次いで、10 \times NEB2緩衝液11 μ l、制限酵素Not I 100 U/10 μ l を加え、37 $^{\circ}$ Cで3時間反応させた。両端をそれぞれ制限酵素で切断した、 μ 鎖をコードするDNA断片は、0.8 %アガロースゲルを用いた電気泳動により、約690 bp 近辺のバンドとして分離したものを切り出し回収した。これを、市販の精製キット；QIAGEN製QIAquick Gel Extraction Kit を用いて精製し、 μ 鎖をコードするDNA断片をTE緩衝液 20 μ l で溶出回収した。

【0024】同様に、得られた κ 鎖をコードするcDNAのPCR 産物は、先ず、10 \times NEB2緩衝液11 μ l、制限酵素Asc I 100 U/5 μ l を加え、37 $^{\circ}$ Cで3時間反応させた。次いで、10 \times NEB2緩衝液11 μ l、制限酵素Nhe I 100 U/10 μ l を加え、37 $^{\circ}$ Cで3時間反応させた。両端をそれぞれ制限酵素で切断した、 κ 鎖をコードするDNA断片は、0.8 %アガロースゲルを用いた電気泳動により、約660 bp近辺のバンドとして分離したものを切り出し回収した。これを、市販の精製キット；QIAGEN製QIAquick Gel Extraction Kit を用いて精製し、 κ 鎖をコードするDNA断片をTE緩衝液 20 μ l で溶出回収した。

【0025】（3）発現ベクターの構築並びに該発現ベクターの導入による形質転換大腸菌の作製
前記（2）で採取された、両端に制限酵素による切断を施した μ 鎖をコードするDNA断片と κ 鎖をコードする

を混合したものを、3'側プライマーとして、FDM プライマーを、それぞれ用いた。それぞれ独立にPCR 反応を行い、個別に選択的な増幅産物を得た。なお、PCR 反応は、全液量100 μ l とし、先に調製したcDNAに対して、増幅用プライマー量は各100pmol 用い、Touch down PCR法のプロトコールに従い反応を行った。

【0021】

【表1】

DNA断片は、大腸菌内でFab 抗体の発現に利用されるベクター系；pFab-His2 ベクター内のそれぞれのクロニングサイトに下記する手順で組み込んだ。即ち、 κ 鎖（L鎖）をコードするcDNAを、制限酵素Nhe I 切断部位とAsc I 切断部位の間に、 μ 鎖（H鎖）をコードするcDNAを、制限酵素Sfi I 切断部位とNot I 切断部位の間に、それぞれ組み込んだ。組み込むDNA断片は二種類あるので、先ず、 κ 鎖をコードするDNA断片を組み込んだベクターを構築し、次いで、更に μ 鎖をコードするDNA断片を組み込み、二鎖の遺伝子がともに組み込まれた発現ベクターを得た。なお、用いた発現ベクターpFab-His2 は、発明者らにより第45回日本ウイルス学会総会アブストラクトp.71（1997）に報告されている。図1に示すとおり、該発現ベクターpFab-His2 は、マーカー遺伝子としてアンピシリン耐性遺伝子（Amp^r）を有しており、H鎖並びにL鎖をコードするDNAを挿入するクロニングサイトとして、二種のベクター溶解リーダー配列の下流に制限酵素Nhe I とAsc I の切断部位及び制限酵素Sfi I とNot I の切断部位を持ち、この遺伝子の発現は、tac プロモーター（Ptac）により行われる。

【0026】（3-1） κ 鎖をコードするDNA断片の組み込み

導入ベクターpFab-His2 10 μ g/100 μ l は、先ず、10 \times NEB2緩衝液11 μ l、制限酵素Asc I 50 U/2.5 μ l を加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。次いで、10 \times NEB2緩衝液11 μ l、制限酵素Nhe I 50 U/5 μ l を加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。この二種の制限酵素で切断した、pFab-His2 に相当するDNA断片は、0.8 %アガロースゲルを用いた電気泳動により、3.5 kbp のバンドとして分離し

たものを切り出し回収した。これを、市販の精製キット；QIAquick Gel Extraction Kit を用いて精製し、目的とする3.5 kbp のDNA断片をTE緩衝液 50 μ l で溶出回収した。

【0027】得られたpFab-His2 に相当するDNA断片 90 ng/3 μ l と前記の κ 鎖をコードするDNA断片30 ng/6 μ l とを混合し、市販のライゲーションキット；宝酒造製TaKaRa Ligation Kit Ver.2 のI液9 μ l を加え、16℃で30分間ライゲーション反応を行った。ライゲーション後、反応液に水18 μ l、ペーリンガーマンハイム製分子生物学用ポリエチレングリコール1 μ l、3 M 酢酸ナトリウム3.6 μ l、エタノール80 μ l を加え、-30℃で15分間放置した。放置後、4℃、15,000 rpmで10分間遠心した。この遠心により、目的とする環化されたベクターは沈殿に回収される。沈殿物を風乾した後、水5 μ l に再溶解して、50℃で5分間暖めた。この環化されたベクターで大腸菌を形質転換し、得られた組換え菌を培養することで、多量のプラスミドベクターを調製した。

【0028】具体的には、予め温めた環化したベクター液5 μ l を用いて、市販のコンピテントセル；ライフテクノロジーズ製大腸菌コンピテントセルDH5 α F'T 50 μ l にelectroporation 法を適用して導入した。electroporation 法は、2 mm幅のキューベットを用い、電圧2.5 kV の条件を用いた。通電後、大腸菌はキューベットから室温にした培地 SOC (2% Bacto tryptone/0.5% Bacto yeast extract/10 mM NaCl/2.5 mM KCl/10 mM MgSO₄/10mM Mg Cl₂/20 mM Glucose) 1 ml で洗い出し・回収した。膜再生のため、37℃で1時間振とう培養した。その後、37℃に温めたSB (Super Broth) 培地 (Tryptone 30 g/l、Yeast extract 20 g/l、3-モルホリノプロパンスルホン酸(MOPS) 10 g/l、pH 7.0) 10 ml (アンピシリン：50 μ g/ml添加) を加えた。この際、一部菌液それぞれ10 μ l と100 μ l を採取し、タイトレーションのためにプレートに播いた。残る菌液は、37℃で一夜振とう培養した。このタイトレーションの結果、コロニーサイズは、7.7 $\times 10^3$ であった。培養した菌体を回収し、市販のプラスミド分離キット；QIAGEN Plasmid Midi Kit を用いてプラスミドを抽出し、TE緩衝液 100 μ l で溶出回収した。前記の培養菌体からの、目的とするプラスミドの回収量は6 μ g であった。

【0029】(3-2) μ 鎖をコードするDNA断片の組み込み

回収された κ 鎖をコードするDNA断片が組み込まれたプラスミドベクター2 μ g/100 μ l に、先ず、10 \times NEB2緩衝液11 μ l、制限酵素Sfi I 20 U/1 μ l を加え、50℃で1時間反応させた。次いで、10 \times NEB2緩衝液11 μ l、制限酵素Not I 20 U/2 μ l を加え、37℃で1時間反応させた。この二種の制限酵素で切断した、pFab-His2 + κ 鎖に相当するDNA断片は、0.8 %アガロースゲルを用

いた電気泳動により、4.2 kbp のバンドとして分離したものを切り出し回収した。これを、市販の精製キット；QIAquick Gel Extraction Kit を用いて精製し、目的とする4.2 kbp のDNA断片をTE緩衝液 50 μ l で溶出回収した。

【0030】得られたpFab-His2 + κ 鎖に相当するDNA断片80 ng/2 μ l と μ 鎖をコードするDNA断片30 ng/2 μ l とを混合し、市販のライゲーションキット；TaKaRaLigation Kit Ver.2 のI液9 μ l を加え、16℃で30分間ライゲーション反応をさせた。ライゲーション後、反応液に水8 μ l、ペーリンガーマンハイム製分子生物学用ポリエチレングリコール1 μ l、3 M 酢酸ナトリウム1.6 μ l、エタノール70 μ l を加え、-30℃で15分間放置した。放置後、4℃、15,000 rpmで10分間遠心した。この遠心により、目的とする環化されたベクターは沈殿に回収される。沈殿物を風乾した後、水5 μ l に再溶解して、50℃で5分間暖めた。この環化されたベクターで大腸菌を形質転換し、得られた組換え菌を培養することで、多量のプラスミドベクターを調製した。

【0031】具体的には、予め温めた環化したベクター液5 μ l を用いて、市販のコンピテントセル；大腸菌コンピテントセルDH5 α F'T 50 μ l にelectroporation 法を適用して導入した。electroporation 法は、2 mm幅のキューベットを用い、電圧2.5kVの条件を用いた。通電後、大腸菌はキューベットから室温にした培地SOC 1 ml で洗い出し・回収した。膜再生のため、37℃で1時間振とう培養した。その後、37℃に温めたSB培地10 ml (アンピシリン 50 μ g/ml添加) を加えた。この際、一部菌液それぞれ10 μ l と100 μ l を採取し、タイトレーションのためにプレートに播いた。残る菌液は、37℃で一夜振とう培養した。

【0032】このタイトレーションの結果、コロニーサイズは、1.1 $\times 10^4$ であった。培養した菌体を回収し、市販のプラスミド分離キット；QIAGEN Plasmid Midi Kit を用いてプラスミドを抽出し、TE緩衝液 600 μ l で溶出回収した。前記の培養菌体からの、目的とするプラスミド、即ち、 κ 鎖をコードするDNA断片及び μ 鎖をコードするDNA断片がともに組み込まれたベクターの回収量は30 μ g であった。

【0033】(4) 単クローンの選別

前記(3)において作製したpFab-His2 に κ 鎖をコードするDNA断片及び μ 鎖をコードするDNA断片がともに組み込まれたプラスミドを大腸菌JM109 株に導入して、形質転換株を作製し、当該発現ベクターから抗ヒトTNF- α ヒトFab 抗体を産生するクローンを採取した。

【0034】具体的には、該発現ベクター1 ngを市販の大腸菌JM109 株のコンピテントセル (東洋紡製) 100 μ l に加えた。次いで、30分間氷上に静置した後、42℃、1 分間のヒートショックを加えた後、再び3分間氷上に

静置した。培地SOC を1 mlを加え、37℃で1時間振とう培養した後、アンピシリンプレート上に各プレート当たり、前記の培養菌液50 μ l ずつを播き、一晚培養しコロニーを出現させた。翌日、前記のアンピシリンプレート上、プレート1枚当たり数十〜百数十個のコロニーが出現していた。

【0035】これらのクローンの抗ヒトTNF- α ヒトFab 抗体の産生能を調べ、産生能の高い単一クローンを選別するため、12個のコロニーを無作為に拾い出し、先ず、それぞれSB培地2 ml (20 mM 塩化マグネシウム、アンピシリン50 μ g/ml添加) 中、37℃で6時間振とう培養した。その後、発現を誘導するため、IPTGを終濃度0.05 mM となる量添加して、30℃で一晩振とう培養した。

【0036】翌日、培養液から、大腸菌を遠心 (1,500 \times g、15分間) で集菌した。集めた大腸菌は、0.2 mlのリン酸緩衝液(PBS) (1mg/mlリゾチーム、1 \times complete; ペーリンガー社製プロテアーゼ阻害剤カクテルを添加) に懸濁し、室温で30分間放置した後、freezing-thawing (ドライアイス-エタノール液と37℃の温水に交互に5分間ずつ浸す処理) を計4回繰り返して、菌体を破碎した。遠心 (エッペンドルフチューブ内で、15,000 rpm、10分間) 後、上清を回収した。産生される組換え型ヒトFab 抗体は、可溶性であるため、この上清に回収される。市販のヒトTNF- α (生化学工業#200457、5 μ g/ml) を抗原として用いて、該上清中に含まれる抗ヒトTNF- α 抗体濃度をELISA法で定量した。ELISAプレートは、ヒトTNF- α 液を50 μ l/wellずつコーティングし、翌日PBS -0.05% Tween20 300 μ l/wellで3回洗浄した後、各クローンから得た上清試料50 μ l ずつを二連で反応させた。室温で1時間反応させた後、PBS -0.05% Tween20 300 μ l/wellで3回洗浄して、未反応の抗体を除去した。酵素標識抗体として、市販のペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG (Fab 特異的) 抗体 (SIGMA製、#A 0293) をPBS -0.05% Tween20で1:1,000に希釈した溶液50 μ l/wellを加えて、反応させた。室温で1時間反応させた後、PBS -0.05% Tween20 300 μ l/wellで3回洗浄して、未反応の酵素標識抗体を除去した。検出には、標識のペルオキシダーゼ量を、市販の基質; ライフテクノロジー製のTMB-ELISA を50 μ l/wellに加え、室温で30分間放置後、650 nmの吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。発色量OD_{650 nm} が0.3以上を示すものは、抗ヒトTNF- α ヒトFab 抗体の産生能が高い陽性クローンと判定した。評価を試みた12個のコロニーのうち、陽性クローン4個が存在していた。この4個のクローンから、発現ベクターを再度抽出して、 κ 鎖をコードするDNA断片及び μ 鎖をコードするDNA断片の存在を確認し、また、その塩基配列の再シーケンシングを行ったところ、4つのクローンは当然のことながら、全く同じ塩基配列であった。即ち、上述の塩基配列(I)及び塩基配列(II)に示されるものであった。

【0037】従って、この4つのクローンは、遺伝子は全く同じであり、同一の菌株であることになる。この一つ E. coli JM109/pID5-1 は、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 FERM P-16443 として寄託されている。この菌株中に保持されている抗ヒトTNF- α ヒトFab 発現ベクターpID5-1の概略図を図2に示す。

【0038】本発明の組換え型抗ヒトTNF- α ヒトモノクローナル抗体は、具体的には、上述するとおり該寄託されている菌株により産生される組換え型抗体であるが、そのH鎖が前記アミノ酸配列(I)で示され、かつL鎖が前記アミノ酸配列(II)で示されるものである限り、これ以外の菌株により産生されるものであっても同じ反応性を示すものである。具体的には、前記の菌株中に保持されている発現ベクターを抽出し、別の菌株の大腸菌、例えば、JM101, JM105, HB101 株等に導入した形質転換菌株によっても、同じく生産することができる。更には、発現ベクター中に組換えられている遺伝子情報、即ち、前記塩基配列(I)並びに塩基配列(II)のみでなく、宿主大腸菌内で前記アミノ酸配列(I)並びにアミノ酸配列(II)のペプチド鎖に翻訳される限り、同じアミノ酸に翻訳される他のコドンに置き換えられていてもよい。この種の改変は、元となる塩基配列が判明しているので、常法に従い、適宜等価なコドンに変換することができ、対応するDNAは、いずれも700 bp以下であるので、DNA合成法を適用することもでき、あるいは、PCR法を適用した改変導入の手段を用いることもできる。

【0039】また、本発明の組換え型ヒトFab 抗体は、本来そのH鎖は、前記アミノ酸配列(I)の μ 鎖であり、L鎖は、前記アミノ酸配列(I)の κ 鎖であるが、実質的にこのアミノ酸配列を保つものも、本発明の組換え型ヒトFab 抗体に含まれる。具体的には、H鎖のC末端が更に伸長されているもの、即ち、Fc領域に至る間のアミノ酸配列が更に付加されたものであってもよく、また、L鎖並びにH鎖において、その配列可変部分は、抗原に依存するので保持されねばならないが、残る定常部分のアミノ酸配列は、天然のヒト免疫グロブリンの μ 鎖並びに κ 鎖においても許容されている範囲で種々の改変が存在してもよい。これらの付加、欠失又は置換による改変は、既に報告されている幾つかのヒト免疫グロブリンの遺伝子情報を元にして容易に行うことができる。

【0040】例えば、図4に示す本発明の組換え型ヒトFab 抗体の κ 鎖のアミノ酸配列を基に、抗体の特異的な反応性に関与する相補性決定領域(CDR)のアミノ酸配列を保持する限り、それ以外の部分は、図5及び図6に示す別種のヒト抗体の κ 鎖のアミノ酸配列と対比・参照して、そこに存在するアミノ酸配列と一部を置き換えることもできる。

【0041】本発明の組換え型ヒトFab 抗体は、宿主大腸菌により産生されるものであるため、汎用の手段によ

り容易に不純物、汚染蛋白質等の除去ができ、極めて純度の高いものを得ることができる。実験試薬として利用する際には、通常の抗体試料と同様に標準力価、あるいは、標準濃度の溶液とするのがよい。また、臨床応用する際には、従来のヒト抗体と同様の精製を施した上で、目的に応じた溶液組成物に調製するとよい。なお、生産に用いる細胞が、大腸菌であるので、精製の操作は、従来の医療用の組換え蛋白質の精製に利用される手法に準じることができ、技術的な困難さは、動物細胞により生産する際に較べて、格段に少ないものである。

【0042】

【実施例】以下に、本発明の組換え型抗ヒトTNF- α ヒトモノクローナル抗体、それに用いる κ 鎖をコードするDNA断片及び μ 鎖をコードするDNA断片とその遺伝子情報、並びにこの組換え型ヒトモノクローナル抗体を産生する大腸菌株の作製に関して、具体例を挙げて詳しく説明する。

【0043】本例では、健康人から提供された血液試料から、リンパ球を分別し、EBウイルスを感染させ、トランスフォームした細胞株群を作製し、次いで、これか

ら、抗ヒトTNF- α ヒトモノクローナル抗体産生株1D

5株 (EBV transformed B lymphocytes oligo clone)

κ 鎖と λ 鎖をコードするcDNAをそれぞれ選択的に増幅するためのプライマー

κ 鎖5'側プライマー
VK1F5 5'-CGCTAGCGMCATYCAAGTACCCAGTCTCC-3
VK2aF5 5'-CGCTAGCGATRTTGTGATGACVCAGWCTCC-3
VK3aF5 5'-CGCTAGCGMCATYCAAGTACCCAGTCTCC-3
VK4F5 5'-CGCTAGCGACATCGWGTGACCCAGTCTCC-3
 κ 鎖3'側プライマー
VKC3 5'-TTGGCGGCCACACTCTCCCTGTGTAAGCTCTT-3
 λ 鎖5'側プライマー
VL1aF5 5'-CGCTAGCCAGTCTGVSCTGACTCAGCCW-3
VL1bF5 5'-CGCTAGCCAGTCTGTGTGACGACAGCCG-3
VL2aF5 5'-CGCTAGCMACKTATATYTGACTCAAACG-3
VL2bF5 5'-CGCTAGCCAGACTGTGTGTAACVCAGGAG-3
VL3aF5 5'-CGCTAGCTCCTATGAGCTGACTCAGCCA-3
VL3bF5 5'-CGCTAGCTCTTCTGAGCTGACTCAGGAC-3
 λ 鎖3'側プライマー
VLC3 5'-TTGGCGGCCGTAAMATKCTGTAGSGGCCACTGT-3

R: A又はG, Y: C又はT, W: A又はT, S: G又はC, K: G又はT, M: A又はC, H: A又はC又はT

【0046】

【表3】

γ 鎖と μ 鎖をコードするcDNAをそれぞれ選択的に増幅するためのプライマー

γ 鎖及び μ 鎖5'側プライマー
VH1aF5 5'-AAGGCCCAACCGGOCATGGCCAGGTGCGAGTGGTGAGTCTGG-3
VH1bF5 5'-AAGGCCCAACCGGOCATGGCCAGRTYCAAGTGGTGAGTCTGG-3
VH2aF5 5'-AAGGCCCAACCGGOCATGGCCAGSTRCAAGTGCAGSAGTCRGG-3
VH3aF5 5'-AAGGCCCAACCGGOCATGGCCSARGTGCGAGTGTGGAGTCTGG-3
VH3bF5 5'-AAGGCCCAACCGGOCATGGCCAGTGTGAGGTGCAGTGGTGG-3
VH4cF5 5'-AAGGCCCAACCGGOCATGGCCAGGTGCGAGTACAGSAGTGGGG-3
 γ 鎖3'側プライマー
FDG1H3 5'-CGCGGGCGCTGTGTGAGTTTGTGTCACAAGATTI-3
FDG2H3 5'-CGCGGGCGCTTTGCGCTCAACTGTCTGTGTCAC-3
FDG3H3 5'-CGCGGGCGCTGTGTGAGTTGTGTCACCAAGTTGG-3
FDG4H3 5'-CGCGGGCGCTGGGGGACATATTGGACTCAAC-3
 μ 鎖3'側プライマー
FDM 5'-CGCGGGCGCCAGCTCAGCAATCACTGGAAGAGG-3

R: A又はG, Y: C又はT, W: A又はT, S: G又はC, K: G又はT, M: A又はC, H: A又はC又はT

【0047】その結果、この抗ヒトTNF- α ヒトモノクローナル抗体産生株1D5株 (EBVtransformed B lymphocytes oligo clone) から、L鎖をコードするcDNAとして、 λ 鎖のものが1種、 κ 鎖のものが3種、H鎖

を選抜して、この細胞株を元となるBリンパ球細胞として用いた。

【0044】ヒト抗体においては、抗原結合部位に当たる可変領域を除き、それ以外の部分は本質的に同一であることが既に報告されており、その性質を利用して、本例では、産生するBリンパ球細胞から抽出した全RNAから、RT-PCR法を適用して、このL鎖における、 κ 鎖と λ 鎖の2種を分別するアミノ酸配列に着目して、それぞれを選択的に増幅可能なPCRプライマーを用いて、予め κ 鎖と λ 鎖の区別をして、それぞれのcDNAを調製・増幅した。同じく、H鎖に関しても、 γ 鎖と μ 鎖に分類されるもののみを、それぞれ予め区別するPCRプライマーを用いて、選択的にcDNAを調製・増幅した。具体的には、 κ 鎖と λ 鎖をコードするcDNAをそれぞれ選択的に増幅するためのプライマー、 γ 鎖と μ 鎖をコードするcDNAをそれぞれ選択的に増幅するためのプライマーは、それぞれ下記の表2と表3に示すものを用いた。また、全RNAから逆転写によりcDNAを調製する際には、ランダム9merを用いた。

【0045】

【表2】

をコードするcDNAとして、 γ 鎖のものが1種、 μ 鎖のものが1種、それぞれ存在することが判明し、該1D5株は実際にオリゴクローンであったことが確認された。

【0048】分離されたL鎖をコードするcDNA、具

体的には、 λ 鎖のものが1種、 κ 鎖のものが3種、H鎖をコードするcDNA、具体的には、 γ 鎖のものが1種、 μ 鎖のものが1種から、L鎖をコードするcDNAとH鎖をコードするcDNAの各組み合わせについて、大腸菌においてFab抗体を産生する発現ベクターpFab-His2にクローニングして、それぞれ発現ベクターを作製した。この複数種の発現ベクターをそれぞれ宿主大腸菌JM109株に導入して、用いた発現ベクター内のマーカー遺伝子；アンピシリン耐性遺伝子を用いて、アンピシリンプレート上でコロニーを形成させ、各クローンを分離した。得られたコロニーから、無作為にコロニーを拾い出し、培養してIPTGを添加し、Fab抗体産生を誘導した。その後、集菌し、凍結融解により菌体を破碎し、遠心により不溶性画分を分離し、上清を採取した。Fab抗体は、可溶性蛋白質として、この上清に回収されており、ヒトTNF- α に対する反応性を有するFab抗体の有無を調べた。

【0049】前記の上清について、ヒトTNF- α を抗原とし、検出用抗体として、Fab特異的抗ヒトIgG抗体を用いてELISA法で評価したところ、L鎖をコードするcDNAとして、 κ 鎖3種類のうち、1種類のものと、H鎖をコードするcDNAとして、 μ 鎖1種類のものとを組み合わせたクローンのみにヒトTNF- α に対する反応性が確認された。この組換え型モノクローナル抗体である抗ヒトTNF- α ヒトFab抗体を産生する菌株を作製する手順について、以下に具体的に述べる。

【0050】(1) 全RNAの採取

健康人のリンパ球細胞をEBウイルスでトランスフォームした細胞群から、抗ヒトTNF- α ヒト抗体を産生する細胞株を選別した。このオリゴクローン；抗ヒトTNF- α ヒトモノクローナル抗体産生株1D5株の細胞 10^6 cellsから、市販の全RNA採取・精製キット；QIAGEN製RNeasyを用いて、全RNAを採取した。なお、詳細な操作手順は、該キットの標準プロトコールに従い、最終的に全RNAを水50 μ lに抽出した液を得た。含まれる全RNA量を、OD_{260nm}（波長260nmにおける吸光度；RNA分子による吸収）値から算定したところ、58 ng/ μ lであった。

【0051】(2) RT-PCR法によるL鎖をコードするcDNAとH鎖をコードするcDNAの作製

前記(1)で調製した全RNAから逆転写反応により、cDNAを作製し、次いで、PCR法を応用して、L鎖をコードするcDNAとH鎖をコードするcDNAをそれぞれ独立に増幅した。このRT-PCR法の操作には、市販のキット；宝酒造製のRNA PCR Kitを用い、具体的な操作は該キットの標準プロトコールに準じた。まず、添付される逆転写反応液20 μ l当たり、全RNA抽出液2 μ lを用い、逆転写プライマーとして、ランダム9merのプライマーを利用して、cDNAを調製した。

【0052】 κ 鎖をコードするcDNAのPCR増幅に

は、5'側プライマーとして、前述した表1のVK3aF5プライマーを、3'側プライマーとして、表1のVKC3プライマーを、また、 μ 鎖をコードするcDNAのPCR増幅には、5'側プライマーとして、表1のVH3aF5プライマーとVH3bF5プライマーの二種を混合したものを、3'側プライマーとして、表1のFDMプライマーを、それぞれ用いた。それぞれ独立にPCR反応を行い、個別に選択的な増幅産物を得た。なお、PCR反応は、全液量100 μ lとし、先に調製したcDNAに対して、増幅用プライマー量は各100pmol用い、Touch down PCR法のプロトコールに従い反応を行った。

【0053】得られたPCR産物は、市販の精製キット；QIAGEN製QIAquick PCR Purification Kitを用いて精製し、TE緩衝液（10 mM トリス塩酸、pH 8.0/1 mM EDTA）100 μ lで溶出回収した。得られた μ 鎖をコードするcDNAのPCR産物は、まず、10 \times NEB2緩衝液11 μ l、制限酵素Sfi I 100 U/10 μ lを加え、50 $^{\circ}$ Cで3時間反応させた。次いで、10 \times NEB2緩衝液11 μ l、制限酵素Not I 100 U/10 μ lを加え、37 $^{\circ}$ Cで3時間反応させた。両端をそれぞれ制限酵素で切断した、 μ 鎖をコードするDNA断片は、0.8%アガロースゲルを用いた電気泳動により、約690 bp近辺のバンドとして分離したものを切り出し回収した。これを、市販の精製キット；QIAGEN製QIAquick Gel Extraction Kitを用いて精製し、 μ 鎖をコードするDNA断片をTE緩衝液20 μ lで溶出回収した。

【0054】同様に、得られた κ 鎖をコードするcDNAのPCR産物は、まず、10 \times NEB2緩衝液11 μ l、制限酵素Asc I 100 U/5 μ lを加え、37 $^{\circ}$ Cで3時間反応させた。次いで、10 \times NEB2緩衝液11 μ l、制限酵素Nhe I 100 U/10 μ lを加え、37 $^{\circ}$ Cで3時間反応させた。両端をそれぞれ制限酵素で切断した、 κ 鎖をコードするDNA断片は、0.8%アガロースゲルを用いた電気泳動により、約660 bp近辺のバンドとして分離したものを切り出し回収した。これを、市販の精製キット；QIAquick Gel Extraction Kitを用いて精製し、 κ 鎖をコードするDNA断片をTE緩衝液20 μ lで溶出回収した。

【0055】(3) 発現ベクターの構築並びに該発現ベクターの導入による形質転換大腸菌の作製

前記(2)で採取された、両端に制限酵素による切断を施した μ 鎖をコードするDNA断片と κ 鎖をコードするDNA断片は、大腸菌内でFab抗体の発現に利用されるベクター系；pFab-His2ベクター内のそれぞれのクローニングサイトに下記する手順で組み込んだ。組み込むDNA断片は二種類あるので、まず、 κ 鎖をコードするDNA断片を組み込んだベクターを構築し、次いで、更に μ 鎖をコードするDNA断片を組み込み、二鎖の遺伝子がともに組み込まれた発現ベクターを得た。図1に示す該発現ベクターpFab-His2は、マーカー遺伝子としてアンピシリン耐性遺伝子(Amp^r)を有しており、H鎖並びにL鎖をコードするDNAを挿入するクローニングサイ

トとして、二種のベクター溶解リーダー配列の下流に制限酵素Nhe I とAsc I の切断部位及び制限酵素Sfi I とNot I の切断部位を持ち、この遺伝子の発現は、tac プロモーター(Ptac)により行われる。

【0056】(3-1) κ 鎖をコードするDNA断片の組み込み

導入ベクターpFab-His2 10 μ g/100 μ l は、先ず、10 \times NEB2緩衝液11 μ l、制限酵素Asc I 50 U/2.5 μ l を加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。次いで、10 \times NEB2緩衝液11 μ l、制限酵素Nhe I 50 U/5 μ l を加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。この二種の制限酵素で切断した、pFab-His2 に相当するDNA断片は、0.8 %アガロースゲルを用いた電気泳動により、3.5 kbp のバンドとして分離したものを切り出し回収した。これを、市販の精製キット；QIAquick Gel Extraction Kit を用いて精製し、目的とする3.5 kbp のDNA断片をTE緩衝液 50 μ l で溶出回収した。

【0057】得られたpFab-His2 に相当するDNA断片 90 ng/3 μ l と前記の κ 鎖をコードするDNA断片30 ng/6 μ l とを混合し、市販のライゲーションキット；宝酒造製TaKaRa Ligation Kit Ver.2 のI液9 μ l を加え、16 $^{\circ}$ Cで30分間ライゲーション反応を行った。ライゲーション後、反応液に水18 μ l、パーリンガーマンハイム製分子生物学用ポリエチレングリコール1 μ l、3 M 酢酸ナトリウム3.6 μ l、エタノール80 μ l を加え、-30 $^{\circ}$ Cで15分間放置した。放置後、4 $^{\circ}$ C、15,000 rpmで10分間遠心した。この遠心により、目的とする環化されたベクターは沈殿に回収される。沈殿物を風乾した後、水5 μ l に再溶解して、50 $^{\circ}$ Cで5分間暖めた。この環化されたベクターで大腸菌を形質転換し、得られた組換え菌を培養することで、多量のプラスミドベクターを調製した。

【0058】具体的には、予め温めた環化したベクター液5 μ l を用いて、市販のコンピテントセル；ライフテクノロジーズ製大腸菌コンピテントセルDH5 α F'T 50 μ l にelectroporation法を適用して導入した。electroporation法は、2 mm幅のキューベットを用い、電圧2.5 kVの条件を用いた。通電後、大腸菌はキューベットから室温にした培地 SOC（市販品、LIFE TECHNOLOGIES 社製）1 mlで洗い出し・回収した。膜再生のため、37 $^{\circ}$ Cで1時間振とう培養した。その後、37 $^{\circ}$ Cに温めたSB培地10 ml

（アンピシリン：50 μ g/ml添加）を加えた。この際、一部菌液それぞれ10 μ lと100 μ lを採取し、タイトレーションのためにプレートに播いた。残る菌液は、37 $^{\circ}$ Cで一夜振とう培養した。このタイトレーションの結果、コロニーサイズは、7.7 $\times 10^3$ であった。培養した菌体を回収し、市販のプラスミド分離キット；QIAGEN Plasmid Midi Kit を用いてプラスミドを抽出し、TE緩衝液 100 μ lで溶出回収した。前記の培養菌体からの、目的とするプラスミドの回収量は6 μ gであった。

【0059】(3-2) μ 鎖をコードするDNA断片の組み込み

回収された κ 鎖をコードするDNA断片が組み込まれたプラスミドベクター2 μ g/100 μ lに、先ず、10 \times NEB2緩衝液11 μ l、制限酵素Sfi I 20 U/1 μ lを加え、50 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。次いで、10 \times NEB2緩衝液11 μ l、制限酵素Not I 20 U/2 μ lを加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。この二種の制限酵素で切断した、pFab-His2 + κ 鎖に相当するDNA断片は、0.8 %アガロースゲルを用いた電気泳動により、4.2 kbp のバンドとして分離したものを切り出し回収した。これを、市販の精製キット；QIAquick Gel Extraction Kit を用いて精製し、目的とする4.2 kbp のDNA断片をTE緩衝液 50 μ lで溶出回収した。

【0060】得られたpFab-His2 + κ 鎖に相当するDNA断片80 ng/2 μ lと μ 鎖をコードするDNA断片30 ng/2 μ lとを混合し、市販のライゲーションキット；TaKaRa Ligation Kit Ver.2 のI液9 μ lを加え、16 $^{\circ}$ Cで30分間ライゲーション反応をさせた。ライゲーション後、反応液に水8 μ l、パーリンガーマンハイム製分子生物学用ポリエチレングリコール1 μ l、3 M 酢酸ナトリウム1.6 μ l、エタノール70 μ lを加え、-30 $^{\circ}$ Cで15分間放置した。放置後、4 $^{\circ}$ C、15,000 rpmで10分間遠心した。この遠心により、目的とする環化されたベクターは沈殿に回収される。沈殿物を風乾した後、水5 μ lに再溶解して、50 $^{\circ}$ Cで5分間暖めた。この環化されたベクターで大腸菌を形質転換し、得られた組換え菌を培養することで、多量のプラスミドベクターを調製した。

【0061】具体的には、予め温めた環化したベクター液5 μ lを用いて、市販のコンピテントセル；大腸菌コンピテントセルDH5 α F'T 50 μ lにelectroporation法を適用して導入した。electroporation法は、2 mm幅のキューベットを用い、電圧2.5kVの条件を用いた。通電後、大腸菌はキューベットから室温にした培地 SOC（市販品、LIFE TECHNOLOGIES 社製）1 mlで洗い出し・回収した。膜再生のため、37 $^{\circ}$ Cで1時間振とう培養した。その後、37 $^{\circ}$ Cに温めたSB培地10 ml（アンピシリン 50 μ g/ml添加）を加えた。この際、一部菌液それぞれ10 μ lと100 μ lを採取し、タイトレーションのためにプレートに播いた。残る菌液は、37 $^{\circ}$ Cで一夜振とう培養した。

【0062】このタイトレーションの結果、コロニーサイズは、1.1 $\times 10^4$ であった。培養した菌体を回収し、市販のプラスミド分離キット；QIAGEN Plasmid Midi Kitを用いてプラスミドを抽出し、TE緩衝液 600 μ lで溶出回収した。前記の培養菌体からの、目的とするプラスミド、即ち、 κ 鎖をコードするDNA断片及び μ 鎖をコードするDNA断片がともに組み込まれたベクターの回収量は30 μ gであった。

【0063】(4) 単クローンの選別

前記(3)において作製したpFab-His2 に κ 鎖をコード

するDNA断片及び μ 鎖をコードするDNA断片がともに組み込まれたプラスミドを大腸菌JM109株に導入して、形質転換株を作製し、当該発現ベクターから抗ヒトTNF- α ヒトFab抗体を産生するクローンを採取した。

【0064】具体的には、該発現ベクター1 ngを市販の大腸菌JM109株のコンピテントセル（東洋紡製）100 μ lに加えた。次いで、30分間氷上に静置した後、42℃、1分間のヒートショックを加えた後、再び3分間氷上に静置した。培地SOC（市販品、LIFE TECHNOLOGIES社製）1 mlを加え、37℃で1時間振とう培養した後、アンピシリンプレート上に各プレート当たり、前記の培養菌液50 μ lずつを播き、一晚培養しコロニーを出現させた。翌日、前記のアンピシリンプレート上、プレート1枚当たり数十～百数十個のコロニーが出現していた。

【0065】これらのクローンの抗ヒトTNF- α ヒトFab抗体の産生能を調べ、産生能の高い単一クローンを選別するため、12個のコロニーを無作為に拾い出し、先ず、それぞれSB培地2 ml（20 mM 塩化マグネシウム、アンピシリン50 μ g/ml添加）中、37℃で6時間振とう培養した。その後、発現を誘導するため、IPTGを終濃度0.05 mMとなる量添加して、30℃で一晩振とう培養した。

【0066】翌日、培養液から、大腸菌を遠心（1,500 \times g、15分間）で集菌した。集めた大腸菌は、0.2 mlのリン酸緩衝液（PBS）（1mg/mlリゾチーム、1 \times complete；ペーリンガー社製プロテアーゼ阻害剤カクテルを添加）に懸濁し、室温で30分間放置した後、freezing-thawing（ドライアイスエタノール液と37℃の温水に交互に5分間ずつ浸す処理）を計4回繰り返して、菌体を破碎した。遠心（エッペンドルフチューブ内で、15,000 rpm、10分間）後、上清を回収した。産生される組換え型ヒトFab抗体は、可溶性であるため、この上清に回収される。市販のヒトTNF- α （生化学工業#200457、5 μ g/ml）を抗原として用いて、該上清中に含まれる抗ヒトTNF- α 抗体濃度をELISA法で定量した。ELISAプレートは、ヒトTNF- α 液を50 μ l/wellずつコーティングし、翌日PBS-0.05% Tween20 300 μ l/wellで3回洗浄した後、各クローンから得た上清試料50 μ lずつを二連で反応させた。室温で1時間反応させた後、PBS-0.05% Tween20 300 μ l/wellで3回洗浄して、未反応の抗体を除去した。酵素標識抗体として、市販のペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG（Fab特異的）抗体（SIGMA製、#A 0293）をPBS-0.05% Tween20で1:1,000に希釈した溶液50 μ l/wellを加えて、反応させた。室温で1時間反応させた後、PBS-0.05% Tween20 300 μ l/wellで3回洗浄して、未反応の酵素標識抗体を除去した。検出には、標識のペルオキシダーゼ量を、市販の基質；ライフテクノロジー製のTMB-ELISAを50 μ l/well加え、室温で30分間放置後、650 nmの吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。発色量OD_{650 nm} が0.3以上を示

すものは、抗ヒトTNF- α ヒトFab抗体の産生能が高い陽性クローンと判定した。評価を試みた12個のコロニーのうち、陽性クローン4個が存在していた。この4個のクローンから、発現ベクターを再度抽出して、 κ 鎖をコードするDNA断片及び μ 鎖をコードするDNA断片の存在を確認し、また、その塩基配列の再シーケンシングを行ったところ、4つのクローンは当然のことながら、全く同じ塩基配列であった。即ち、上述の塩基配列（I）及び塩基配列（II）に示されるものであった。具体的には、これらの4つのクローンが保有している発現ベクターは、図2に概略図を示す抗ヒトTNF- α ヒトFab発現ベクターp1D5-1と同じものであった。従って、この4つのクローンは、遺伝子は全く同じであり、同一の菌株であることになる。

【0067】なお、前記手順に準じて、残りの分離されたL鎖をコードするcDNA、具体的には、 λ 鎖のものが1種、 κ 鎖のものが2種、H鎖をコードするcDNA、具体的には、 γ 鎖のものが1種から、L鎖をコードするcDNAとH鎖をコードするcDNAの各組み合わせについて、大腸菌においてFab抗体を産生する発現ベクター系；pFab-His2ベクターにクローニングして、それぞれ組換えベクターを作製し、それぞれ宿主大腸菌JM109株に導入して、用いた発現ベクターpFab-His2内のマーカー遺伝子；アンピシリン耐性遺伝子を用いて、アンピシリンプレート上でコロニーを形成させ、各クローンを分離した。しかしながら、これらの組換え菌は、Fab抗体を産生するものが存在したが、ヒトTNF- α に対する反応性を前記の方法で評価したところ、いずれも反応性を有するものではなかった。なお、同時に分離された残る κ 鎖の2種について、参考のため、その塩基配列並びにそこにコードされるアミノ酸配列を図5と図6に示す。これらの κ 鎖を有するFab抗体は、ヒトTNF- α に対する反応性を有するものではなかった。

【0068】

【発明の効果】本発明の組換え型抗ヒトTNF- α ヒトモノクローナル抗体は、宿主大腸菌により産生されるヒトFab抗体であるので、大量かつ安定に生産でき、加えて、汎用の手段により容易に不純物、汚染蛋白質等の除去ができ、極めて純度の高いものとする事ができる。そのため、実験試薬としての利用、更には臨床応用に適するものである。また、該ヒトFab抗体のH鎖とL鎖をそれぞれコードするDNAは、宿主大腸菌による産生に利用されるのは当然のことであるが、その塩基配列情報に基づき、種々のプライマーの作製にも応用できる。

【0069】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：223

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Ser Gly Asp Leu Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Met Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro
 115 120 125
 Leu Val Ser Cys Glu Asn Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val
 130 135 140
 Gly Cys Leu Ala Gln Asp Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser Trp
 145 150 155 160
 Lys-Tyr Lys Asn Asn Ser Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser
 165 170 175
 Val Leu Arg Gly Gly Lys Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro
 180 185 190
 Ser Lys Asp Val Met Gln Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val
 195 200 205
 Gln His Pro Asn Gly Asn Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val
 210 215 220

【0070】配列番号：2

配列の長さ：669

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列

CAA GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG 48
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 GGC ATG CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG 144
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 GCA GTT ATA TCA TAT GAT GGA AGT AAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG 192
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT 288

23

24

Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		
			85						90					95			
GCG	AAA	GAT	TCC	GGT	GAC	CTT	GCT	TTT	GAT	ATC	TGG	GCC	CAA	GGG	ACA	336	
Ala	Lys	Asp	Ser	Gly	Asp	Leu	Ala	Phe	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr		
			100					105					110				
ATG	GTC	ACC	GTC	TCT	TCA	GGG	AGC	GCA	TCC	GCC	CCA	ACC	CTT	TTC	CCC	384	
Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Ser	Ala	Ser	Ala	Pro	Thr	Leu	Phe	Pro		
			115				120					125					
CTC	GTC	TCC	TGT	GAG	AAT	TCC	CCG	TCG	GAT	ACG	AGC	AGC	GTG	GCC	GTT	432	
Leu	Val	Ser	Cys	Glu	Asn	Ser	Pro	Ser	Asp	Thr	Ser	Ser	Val	Ala	Val		
			130			135					140						
GGC	TGC	CTC	GCA	CAG	GAC	TTC	CTT	CCC	GAC	TCC	ATC	ACT	TTC	TCC	TGG	480	
Gly	Cys	Leu	Ala	Gln	Asp	Phe	Leu	Pro	Asp	Ser	Ile	Thr	Phe	Ser	Trp		
			145		150				155					160			
AAA	TAC	AAG	AAC	AAC	TCT	GAC	ATC	AGC	AGC	ACC	CGG	GGC	TTC	CCA	TCA	528	
Lys	Tyr	Lys	Asn	Asn	Ser	Asp	Ile	Ser	Ser	Thr	Arg	Gly	Phe	Pro	Ser		
			165				170					175					
GTC	CTG	AGA	GGG	GGC	AAG	TAC	GCA	GCC	ACC	TCA	CAG	GTG	CTG	CTG	CCT	576	
Val	Leu	Arg	Gly	Gly	Lys	Tyr	Ala	Ala	Thr	Ser	Gln	Val	Leu	Leu	Pro		
			180				185					190					
TCC	AAG	GAC	GTC	ATG	CAG	GGC	ACA	GAC	GAA	CAC	GTG	GTG	TGC	AAA	GTC	624	
Ser	Lys	Asp	Val	Met	Gln	Gly	Thr	Asp	Glu	His	Val	Val	Cys	Lys	Val		
			195				200					205					
CAG	CAC	CCC	AAC	GGC	AAC	AAA	GAA	AAG	AAC	GTG	CCT	CTT	CCA	GTG		669	
Gln	His	Pro	Asn	Gly	Asn	Lys	Glu	Lys	Asn	Val	Pro	Leu	Pro	Val			
			210			215					220						

【0071】配列番号：3

配列の長さ：214

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列

Glu	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10				15		
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Tyr
			20					25				30			
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile
		35				40					45				
Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Val	Arg	Phe	Ser	Gly
	50				55				60						
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro
	65			70				75					80		
Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	Arg	Asp	Asn	Trp	Pro	Trp
		85					90					95			
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala
		100				105					110				
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly
		115				120				125					
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala
	130					135				140					
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln
	145				150				155				160		

25

26

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

【0072】配列番号：4

配列の長さ：642

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

10 トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列

GAA ATT GTG ATG ACG CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG 48
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 GAA AGG GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC 96
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 TTA GCC TGG TAC CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 TAT GAT GCA TCC AAC AGG GCC ACT GGC ATC CCA GTC AGG TTC AGT GGC 192
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Val Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CTT CAG CGT GAC AAC TGG CCG TGG 288
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Arg Asp Asn Trp Pro Trp
 85 90 95
 ACC TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGA ACT GTG GCT GCA 336
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA 384
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA GAG GCC 432
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG 480
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC 528
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 AGC ACC CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC 576
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GCC CTG AGC TCG CCC GTC ACA AAG AGC 624
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

27

28

195
TTC AAC AGG GGA GAG TGT
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

200

205

642

【0073】配列番号：5

配列の長さ：642

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列

GAC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCT TCC ACC CTG TCT GCA TCT GTA GGA	48
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly	
1 5 10 15	
GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCC AGT CAG AGT ATT AGT AGC TGG	96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp	
20 25 30	
TTG GCC TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCC CCT AAG CTC CTG ATC	144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile	
35 40 45	
TAT AAG GCG TCT AGT TTA GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC	192
Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
50 55 60	
AGT GGA TCT GGG ACA GAA TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT	240
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
65 70 75 80	
GAT GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG TAT AAT AGT TAT TCT CGG	288
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Arg	
85 90 95	
ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGA ACT GTG GCT GCA	336
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala	
100 105 110	
CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA	384
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly	
115 120 125	
ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA GAG GCC	432
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala	
130 135 140	
AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG	480
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln	
145 150 155 160	
GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC	528
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser	
165 170 175	
AGC ACC CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC	576
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr	
180 185 190	
GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCG CCC GTC ACA AAG AGC	624
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser	
195 200 205	
TTC AAC AGG GGA GAG TGT	642
Phe Asn Arg Gly Glu Cys	
210	

【0074】配列番号：6

配列の長さ：214

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列

```

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
          20           25           30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35           40           45
Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
          65           70           75           80
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Arg
          85           90           95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
          100          105          110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
          115          120          125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
          130          135          140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
          145          150          155          160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
          165          170          175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
          180          185          190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
          195          200          205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          210

```

【0075】配列番号：7

配列の長さ：660

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列

```

GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GAC TCC CTG GCT GTG TCT CTG GGC      48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1           5           10           15
GAG AGG GCC ACC ATC AAC TGC AAG TCC AGC CAG AGT GTT TTA TAC AGC      96
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
          20           25           30
TCC AAC AAG AAG AAC TAC CTA GCT TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGA CAG     144
Ser Asn Lys Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
          35           40           45
CCT CCT AAG CTG CTC ATT TAC TGG GCA TCT ACC CGG GAA TCC GGG GTC     192
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
          50           55           60
CCT GAC CGA TTC AGT GGC AGC GGG TCT GAG ACA GAT TTC ACC CTC ACC     240
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Glu Thr Asp Phe Thr Leu Thr

```

31	32
65	70
ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT GTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG GAA	288
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Glu	
85	90
TAT TAT ACT ATT CCT CGG ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC	336
Tyr Tyr Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile	
100	105
AAA CGA ACT GTG GCT GCA CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT	384
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp	
115	120
GAC CAG TTG AAA TCT GGA GCT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC	432
Asp Gln Leu Lys Ser Gly Ala Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn	
130	135
TTC TAT CCC AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC	480
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu	
145	150
CAA TCG GGT AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC	528
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp	
165	170
AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC TAC	576
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr	
180	185
GAG AAA CAC AAA CTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC	624
Glu Lys His Lys Leu Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser	
195	200
TCG CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT	660
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	
210	215
	220

【0076】配列番号：8

トポロジー：直鎖状

配列の長さ：220

30 配列の種類：タンパク質

配列の型：アミノ酸

配列

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly	
1	5
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser	
20	25
Ser Asn Lys Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln	
35	40
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val	
50	55
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Glu Thr Asp Phe Thr Leu Thr	
65	70
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Glu	
85	90
Tyr Tyr Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile	
100	105
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp	
115	120
Asp Gln Leu Lys Ser Gly Ala Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn	
130	135
	140

33

34

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 145 150 155 160
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 165 170 175
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 180 185 190
 Glu Lys His Lys Leu Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 195 200 205
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215 220

【図面の簡単な説明】

【図 1】 Fab 抗体発現ベクター pFab-His2 の構造を示す図。

【図 2】 本発明の組換え型抗ヒト TNF- α ヒト Fab 抗体の発現ベクター pID5-1 の構造を模式的に示す図。

【図 3】 本発明の組換え型抗ヒト TNF- α ヒト Fab 抗体の H 鎖のアミノ酸配列 (I) とそれをコードする cDNA の塩基配列 (I) を示す図。

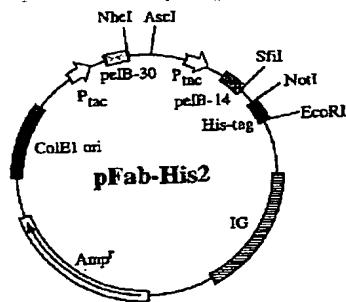
【図 4】 本発明の組換え型抗ヒト TNF- α ヒト Fab 抗体の L 鎖のアミノ酸配列 (II) とそれをコードする cDNA

NA の塩基配列 (II) を示す図。

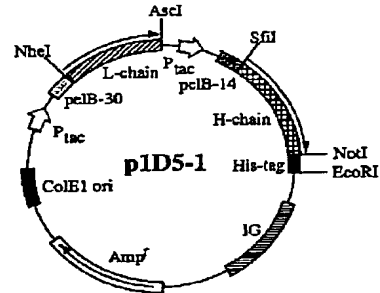
【図 5】 細胞株 1D5 株 (EBV transformed B lymphocyte s oligo clone) から採取された κ 鎖をコードする cDNA 三種の一つの塩基配列及びそれがコードするアミノ酸配列を示す図。

【図 6】 細胞株 1D5 株 (EBV transformed B lymphocyte s oligo clone) から採取された κ 鎖をコードする cDNA 三種の他一つの塩基配列及びそれがコードするアミノ酸配列を示す図。

【図 1】



【図 2】



【図 3】

```

1  CAAGTCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTC  60
   GlnValGlnLeuValGluSerGlyGlyGlyValValGlnProGlyArgSerLeuArgLeu

61  TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCT  120
   SerCysAlaAlaSerGlyPheThrPheSerSerTyrGlyMetHisTrpValArgGlnAla
   ~~~~~
                                CDR1

121 CCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTAATAAATACTAT  180
   ProGlyLysGlyLeuGluTrpValAlaValIleSerTyrAspGlySerAsnLysTyrTyr
   ~~~~~
                                CDR2

181 GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT  240
   AlaAspSerValLysGlyArgPheThrIleSerArgAspAsnSerLysAsnThrLeuTyr
   ~~~~~

241 CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGATTCC  300
   LeuGlnMetAsnSerLeuArgAlaGluAspThrAlaValTyrTyrCysAlaLysAspSer
   ~~~~~

301 GGTGACCTTGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAGGGAGC  360
   GlyAspLeuAlaPheAspileTrpGlyGlnGlyThrMetValThrValSerSerGlySer
   ~~~~~
                                CH1
                                CDR3

361 GCATCCGCCCCCAACCCTTTTCCCCCTCGTCTCCTGTGAGAATTCCCCGTCGGATACGAGC  420
   AlaSerAlaProThrLeuPheProLeuValSerCysGluAsnSerProSerAspThrSer

421 AGCGTGGCCGTTGGCTGCCCTCGCACAGGACTTCCTTCCCGACTCCATCACTTTCTCCTGG  480
   SerValAlaValGlyCysLeuAlaGlnAspPheLeuProAspSerIleThrPheSerTrp

481 AAATACAAGAACAACCTCTGACATCAGCAGCACCCGGGGCTTCCCATCAGTCCTGAGAGGG  540
   LysTyrLysAsnAsnSerAspileSerSerThrArgGlyPheProSerValLeuArgGly

541 GGCAAGTACGCAGCCACCTCACAGGTGCTGCTGCCCTTCCAAGGACGTCATGCAGGGCACA  600
   GlyLysTyrAlaAlaThrSerGlnValLeuLeuProSerLysAspValMetGlnGlyThr

601 GACGAACACGTGGTGTGCAAAGTCCAGCACCCCAACGGCAACAAAGAAAAGAACGTGCCT  660
   AspGluHisValValCysLysValGlnHisProAsnGlyAsnLysGluLysAsnValPro

661 CTTCAGTG  669
   LeuProVal

```

【図 4】

```

1  GAAATTGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGGGCCACC 60
   GluIleValMetThrGlnSerProAlaThrLeuSerLeuSerProGlyGluArgAlaThr

61  CTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCT 120
   LeuSerCysArgAlaSerGlnSerValSerSerTyrLeuAlaTrpTyrGlnGlnLysPro
   ~~~~~
           CDR1

121  GGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGTC 180
   GlyGlnAlaProArgLeuLeuIleTyrAspAlaSerAsnArgAlaThrGlyIleProVal
   ~~~~~
           CDR2

181  AGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCT 240
   ArgPheSerGlySerGlySerGlyThrAspPheThrLeuThrIleSerSerLeuGluPro

241  GAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCTTCAGCGTGACAACTGGCCGTGGACGTTCCGGCCAA 300
   GluAspPheAlaValTyrTyrCysLeuGlnArgAspAsnTrpProTrpThrPheGlyGln
   ~~~~~
           CDR3

301  GGGACCAAGGTGGAAATCAAACGAACGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCA 360
   GlyThrLysValGluIleLysArgThrValAlaAlaProSerValPheIlePheProPro
   ----->
           CL

361  TCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACGCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTAT 420
   SerAspGluGlnLeuLysSerGlyThrAlaSerValValCysLeuLeuAsnAsnPheTyr

421  CCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAG 480
   ProArgGluAlaLysValGlnTrpLysValAspAsnAlaLeuGlnSerGlyAsnSerGln

481  GAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACG 540
   GluSerValThrGluGlnAspSerLysAspSerThrTyrSerLeuSerSerThrLeuThr

541  CTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGC 600
   LeuSerLysAlaAspTyrGluLysHisLysValTyrAlaCysGluValThrHisGlnGly

601  CTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG 642
   LeuSerSerProValThrLysSerPheAsnArgGlyGluCys

```

【図 5】

```

      10      20      30      40      50      60
GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
AspIleGlnLeuThrGlnSerProSerThrLeuSerAlaSerValGlyAspArgValThr

      70      80      90     100     110     120
ATCACTTGCCGGGCCAGTCAGAGTATTAGTAGCTGGTTGGCCCTGGTATCAGCAGAAACCA
IleThrCysArgAlaSerGlnSerIleSerSerTrpLeuAlaTrpTyrGlnGlnLysPro

      130     140     150     160     170     180
GGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATAAGGCGTCTAGTTTAGAAAGTGGGGTCCCATCA
GlyLysAlaProLysLeuLeuIleTyrLysAlaSerSerLeuGluSerGlyValProSer

      190     200     210     220     230     240
AGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACCTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
ArgPheSerGlySerGlySerGlyThrGluPheThrLeuThrIleSerSerLeuGlnPro

      250     260     270     280     290     300
GATGATTTTGCAACTTATTAAGTCCCAACAGTATAATAGTTATTTCTCGGACGTTGGGCCAA
AspAspPheAlaThrTyrTyrCysGlnGlnTyrAsnSerTyrSerArgThrPheGlyGln

      310     320     330     340     350     360
GGGACCAAGGTGGAAATCAAAACGAAGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCA
GlyThrLysValGluIleLysArgThrValAlaAlaProSerValPheIlePheProPro

      370     380     390     400     410     420
TCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTAT
SerAspGluGlnLeuLysSerGlyThrAlaSerValValCysLeuLeuAsnAsnPheTyr

      430     440     450     460     470     480
CCCAGAGAGCCCAAAGTACAGTGGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAG
ProArgGluAlaLysValGlnTrpLysValAspAsnAlaLeuGlnSerGlyAsnSerGln

      490     500     510     520     530     540
GAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACG
GluSerValThrGluGlnAspSerLysAspSerThrTyrSerLeuSerSerThrLeuThr

      550     560     570     580     590     600
CTGAGCAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCCAAGTCACCCATCAGGGC
LeuSerLysAlaAspTyrGluLysHisLysValTyrAlaCysGluValThrHisGlnGly

      610     620     630     640
CTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
LeuSerSerProValThrLysSerPheAsnArgGlyGluCys

```

【図 6】

10 20 30 40 50 60
GAAATGTGTTGACGCGAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACC
GluIleValLeuThrGlnSerProAspSerLeuAlaValSerLeuGlyGluArgAlaThr

70 80 90 100 110 120
ATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTATACAGCTCCAACAAGAAGTACCTAGCT
IleAsnCysLysSerSerGlnSerValLeuTyrSerSerAsnLysLysAsnTyrLeuAla

130 140 150 160 170 180
TGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTCTACTGGGCATCTACCCGG
TrpTyrGlnGlnLysProGlyGlnProProLysLeuLeuIleTyrTrpAlaSerThrArg

190 200 210 220 230 240
GAATCCGGGTCCCTGACCGATTTCAGTGGCAGCGGGTCTGAGACAGATTTCACCCCTACC
GluSerGlyValProAspArgPheSerGlySerGlySerGluThrAspPheThrLeuThr

250 260 270 280 290 300
ATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGGAATATTATACTATT
IleSerSerLeuGlnProGluAspValAlaValTyrTyrCysGlnGluTyrTyrThrIle

310 320 330 340 350 360
CCTCCGACTTTTGGCCAGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGAACCTGTGCTGCACCATCT
ProArgThrPheGlyGlnGlyThrLysLeuGluIleLysArgThrValAlaAlaProSer

370 380 390 400 410 420
GTCTTCATCTTCCCGCATCTGATGACCAGTTGAAATCTGGAGCTGCCTCTGTGTGTGC
ValPheIlePheProProSerAspAspGlnLeuLysSerGlyAlaAlaSerValValCys

430 440 450 460 470 480
CTGCTGAATACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAGGTGGATAACGCCCTC
LeuLeuAsnAsnPheTyrProArgGluAlaLysValGlnTrpLysValAspAsnAlaLeu

490 500 510 520 530 540
CAATCCGGTAACTCCAGGAGAGTGTCAAGAGCAGGACAGCAAGCAGCACCTACAGC
GlnSerGlyAsnSerGlnGluSerValThrGluGlnAspSerLysAspSerThrTyrSer

550 560 570 580 590 600
CTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAACTCTACGCCTGC
LeuSerSerThrLeuThrLeuSerLysAlaAspTyrGluLysHisLysLeuTyrAlaCys

610 620 630 640 650 660
GAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
GluValThrHisGlnGlyLeuSerSerProValThrLysSerPheAsnArgGlyGluCys

フロントページの続き

(72) 発明者 竹腰 史子

神奈川県伊勢原市大住台 3-9-1 ベル

フララズ大住台 2-501